

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Mechanism of the self-assembly of a pore forming toxin triggered by specific membranes

(生体膜特異的な膜孔形成毒素の物性と作用機序)

氏名 田中 耕路

### 【背景】

#### 研究背景と動機

膜蛋白質は生体活動において重要な役割を担っており、機能発現には生体膜上での動的な局在化や自己組織化が重要である。しかしながら、膜蛋白質の自己組織化における分子機構や駆動力の解明は困難であった。これは、膜蛋白質が生体膜の物理化学的性質や生体膜上の様々な分子の影響を受けるためである。

本研究は、生体膜が蛋白質の自己組織化に与える影響を解明する手掛かりとして、溶血性の膜孔形成毒素 Pore-Forming Toxins (PFT)に着目した。PFT は水溶性蛋白質として発現し、生体膜上で構造変化を経て膜貫通型多量体(膜孔)を形成するという、自己組織化に際して最も顕著に生体膜からの影響を受ける蛋白質群である<sup>1</sup>。PFT はまた、病原性細菌の毒素から人間の免疫システム、アポトーシス誘導因子に至るまで幅広い生物種により使用される重要な生体因子でもある<sup>2</sup>。PFT が生体膜上のみで自発的に複合体を形成する機構、及び生体膜の組成がPFTの膜孔形成能に影響を与える分子機構は解明されていない。脂質膜要求性PFTの構造解析及び、PFT-生体膜間の相互作用の速度論および熱力学的測定により、PFTの生体膜上における詳細な自己組織化機構や、その際の生体膜の影響は解明されると考えられる。

本研究の目的は脂質膜要求性PFTの一種であるFragaceatoxin C (FraC)<sup>3,4</sup>をモデル蛋白質として、膜上反応の熱力学的駆動力、及びアミノ酸残基レベルの分子機構を解明することを通じて、膜蛋白質の自己組織化に特徴的な性質、また蛋白質の自己組織化に影響を与える生体膜の性質を明らかにすることである。FraCはSMとコレステロール(Chol)からなる脂質ラフトに特異的に局在し、時間経過と共にラフトドメインの境界領域に集積されることが報告されている<sup>5</sup>。

## 【結果】

### FraC 膜孔の構造学的解析

本研究では FraC の水溶性単量体構造, 脂質に結合した単量体構造, 反応中間体構造, 膜孔構造を高解像度で決定した。本分野最大の課題であった膜孔構造の決定は, 膜結合反応後のサンプルを回収し, 膜蛋白質として再抽出することで達成された。決定された FraC の膜孔構造は 8 量体であった。結晶中において, 膜孔 1 分子につき 24 分子の脂質分子が観察された。脂質の結合位置は 3 種類に分類することができ, 結合位置の一つは隣接した蛋白質の間に存在していた。脂質の影響を考慮しなければ, 膜孔のプロトマー間相互作用界面は  $777 \text{ \AA}^2$  であり, これは安定な複合体を形成するには小さい。しかしながら, 脂質を含めて考えるとプロトマー間の相互作用界面 ( $1002 \text{ \AA}^2$ ) は複合体形成に十分な面積であった。このときのプロトマー間相互作用界面の 37% は脂質の寄与により創出されていた。さらに, 詳細な構造解析と変異体解析の結果より, 膜孔の安定化に寄与する脂質は SM のみであることが示された。SM のみが有する 3-OH は FraC のアミノ酸残基 Arg31 と特異的な相互作用を形成しており, 変異体 FraC(R31A) の膜孔形成能は著しく低下した。これらの結果より, 標的膜由来の特定の脂質が蛋白質同士の結合を仲介することで膜孔構造の安定化に寄与することが明らかになった。

### FraC 膜孔形成機構の構造学的基盤

FraC がジヘキサノイルフォスファチジルコリン(DHPC)と結合することから, SM は膜結合ステップに際しては FraC の特異的レセプターではないことが示された。また, FraC は DOPC のみ, SM のみからなる脂質膜の存在下でもプロテアーゼによる分解から保護されており, FraC は膜結合に際しては強い脂質特異性を有さないことが確かめられた。

FraC 二量体構造は, 膜貫通領域を除いては膜孔と同じ相互作用界面を有しており, 蛋白質間相互作用に寄与しているアミノ酸残基も同じであった。そこで, 2 量体は FraC の多量体化機構を解明する重要な手掛かりになると考え, 詳細な解析を行った。2 量体 A 鎖のラマチャンドラン・プロットをとると, Leu14 と Phe16 の二面角が大きく変化していた。その両者ともが好ましい結合角(favored)から許容される結合角(allowed)に変化, つまり不安定化していた。

### 膜ドメイン依存的な FraC の自己組織化

蛍光物質を充填したりリポソームに対する FraC の膜孔形成能を測定したところ, FraC は DOPC のみ, SM のみからなる膜上では膜孔を形成せず, 両脂質が共存し膜ドメインが形成される条件下でのみ膜孔を形成した。コレステロールの添加により流動性を高めた SM 膜に対しても FraC は活性を有しており, 脂質ドメインの有無や膜の流動性の違いは FraC による膜孔形成に速度論的影響を与えていた。FraC とリポソームとの相互作用の熱力学的解析を行ったところ, FraC はいずれの脂質にも結合するが, 膜ドメイン存在時にのみ構造変化と多量体化に由来する大きな発熱 ( $\Delta H$ ) を示した。興味深いことに, 膜結合と膜孔形成の間の自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) は非常に小さいことが明らかになった。以上の結果から, 脂質ドメインの境界の存在が, FraC の膜挿入過程の活性化エネルギーを下げることで, FraC の膜孔形成が促進されることが解明された。

## 【結論】

以上の結果を統合すると, FraC は生体膜結合の際には脂質特異性を示さないが, SM を含む脂質ドメインの存在下で膜孔を形成する。その過程で脂質ドメインの存在が速度論に FraC の膜孔形成を促進し, また SM が FraC のアセンブリにおけるコファクターとして働くことが, 特定の組成を持った生体膜特異的に FraC が膜孔を形成する理由であった。脂質ドメインの境界には膜のたゆみ(defect)や段差が存在する。このドメイン境界の defect が FraC の膜挿入過程の活性化エネルギーを触媒的に下げることで, 膜孔形成が促進されることが強く示唆された。また, 流動性の高い脂質膜はゆるみを生じ, 脂質ドメイン同様に蛋白質の膜挿入および自己組織化を促進することが示された。さらに, 蛋白質の自発的構造変化機構として, 多量体化によって膜貫通領域の

主鎖のゆがみが誘起されることが、膜貫通領域のコア領域からの離脱と構造変化につながることが示唆された。

本研究は、膜蛋白質の自己組織化が生体膜から与えられる影響を解明するモデルとしてPFTに着目し、構造的な反応機構とその熱力学的駆動力の両者を詳細に解明した点に独創性がある。本研究の持つ意義はPFTが標的膜の脂質を自己組織化の際に部品の一部として取り込むこと、および脂質ドメインの形成という膜のダイナミクスに由来する因子が膜蛋白質の自己組織化のエネルギー障壁を下げることを初めて発見したことである。

#### 【参考文献】

- 1) Iacovache, I., Bischofberger, M. & van der Goot, F. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 241–6 (2010).
- 2) Anderluh, G. & Lakey, J. H. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 482–90 (2008).
- 3) Bellomio, A. *et al. Toxicon* **54**, 869–80 (2009).
- 4) Mechaly, A. E. *et al. Structure* **19**, 181–91 (2011).
- 5) Barlic, A. *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 34209–16 (2004).

#### 【発表論文】

- 1) K. Tanaka, J. M. M. Caaveiro, K. Morante, J. M. González-Mañas & K. Tsumoto, Structural basis for self-assembly of a cytolitic pore lined by protein and lipid. *Nat. Commun.* **6**, 6337 (2015).
- 2) K. Morante, J. M. M. Caaveiro, K. Tanaka, J. M. González-Mañas & K. Tsumoto, A Pore-Forming Toxin Requires a Specific Residue for Its Activity in Membranes with Particular Physicochemical Properties. *J. Biol. Chem.* **290**, 10850–10861 (2015).
- 3) K. Tanaka, J. M. M. Caaveiro & K. Tsumoto, Bidirectional Transformation of a Protein between its Native Water-Soluble and transmembrane Conformations. *Biochemistry.* **54**, 6863–6866 (2015).